

LumioneのATP発光測定<分析能>

Lumione BL-2000 のATP発光測定分析能の信頼性を証明すべく、「検出限界」「定量下限」「直線性」「範囲」「頑健性」について評価した。

1. 検出限界(LOD: Limit of Detection)と定量下限(LOQ: Limit of Quantitation)

検出限界は分析対象試料の検出可能な最低の量または濃度。定量下限とは適切な精度と真度を伴って定量できる、分析対象試料の最低の量または濃度であり、低濃度の物質を定量する場合の分析能パラメータ。^{1, 2)}

低濃度ATP標準溶液を発光測定(図1)して、縦軸を積算発光量(RLU)、横軸をATP量(amol)として検量線を作成(図2)し、ATP抽出液をNC(0 amol)としてその積算発光量のSDと検量線の傾きa (RLU/amol)を用いて下記計算式より算出したところ、LOD 0.2 amol, LOQ 0.5 amolであった。

$$\text{LOD} = 3.3 \text{ SD}/a \quad \text{LOQ} = 10 \text{ SD}/a$$

2. 直線性(Linearity)と範囲(Range)

直線性は分析対象試料の量または濃度に対して直線関係にある測定値を与える能力。範囲とは適切な精度、真度および直線性を与える分析対象試料の上限および下限の量または濃度に挟まれた領域(上限値および下限値を含む)である。^{1, 2)}

高濃度領域を含む5 準以上のATP標準溶液を発光測定(図3)し、検量線を作成して相関関数R²を求めたところ、掲載例では0.9996(図4)となり、0.999 以上の良好な検量線が得られ、0 ~ 5000 amolの範囲で直線性が認められた。

3. 頑健性(Robustness)

分析条件を故意に変動させたときに、測定値が影響を受けにくい能力であり、通常の作業状態における信頼性の指標。^{1, 2)}

高濃度ATP溶液の後にATP抽出液を交互に測定(図5)し、結果に影響を与えるかを確認したところ、キャリーオーバーは認められなかった。

試験方法

■ 試薬

微生物迅速検査試薬キット

1. ATP発光液
2. ATP抽出液 (0 amol)
3. ポジティブコントロール (100 amol)

高濃度ATP溶液

■ 手順

1. ATP抽出液を0 amolとし、ポジティブコントロールもしくは高濃度ATP溶液をATP抽出液で希釈して各濃度のATP標準溶液を調製
2. ATP発光液をLumione BL-2000 にセット
3. 1 のATP標準溶液を各々50 μ Lずつ発光計測チューブに分注
4. 3 を発光計測ラックに並べ、Lumione BL-2000 にセットし、ATP発光測定(自動測定)
5. ATP発光液分注後、2 分間測定したATP発光の積算値(RLU)を縦軸、ATP量(amol)を横軸としてATP検量線を作成し、LOD, LOQを算出

1. 検出限界・定量下限

■ 測定試料:ATP抽出液(0 amol)およびATP抽出液50 μ L中に1, 2, 5, 10 amolのATPを含む溶液(各n=5)

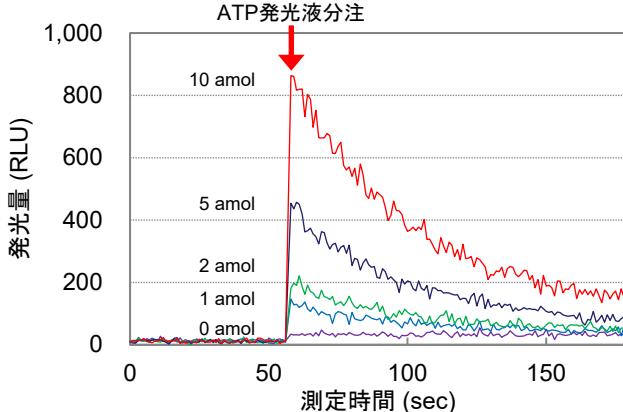


図1 ATP発光測定例

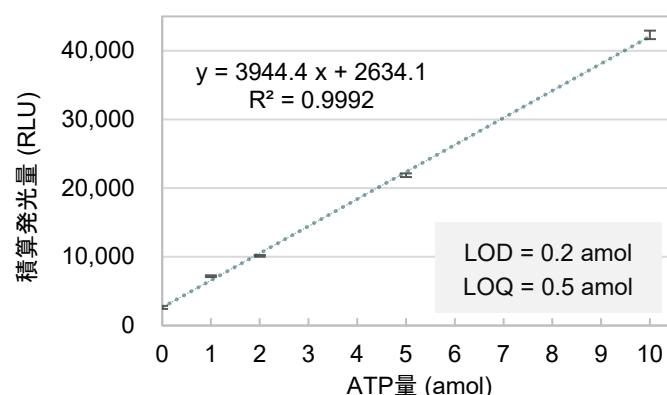


図2 低濃度領域ATP検量線例

2. 直線性・範囲

■ 測定試料: ATP抽出液(0 amol)およびATP抽出液50 μ L中に10, 50, 100, 500, 1000, 5000 amolのATPを含む溶液(各n=5)

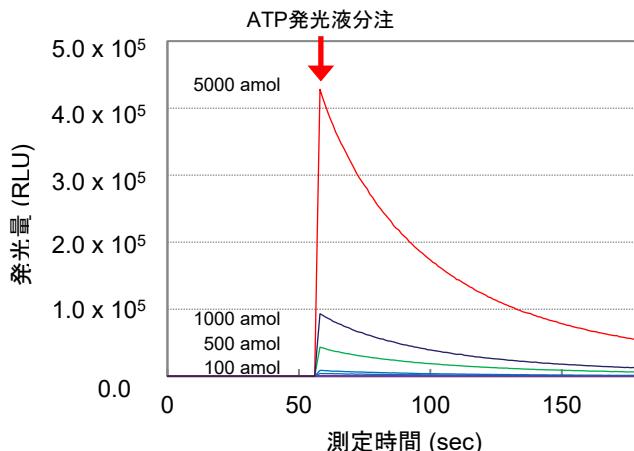


図3 ATP発光測定例

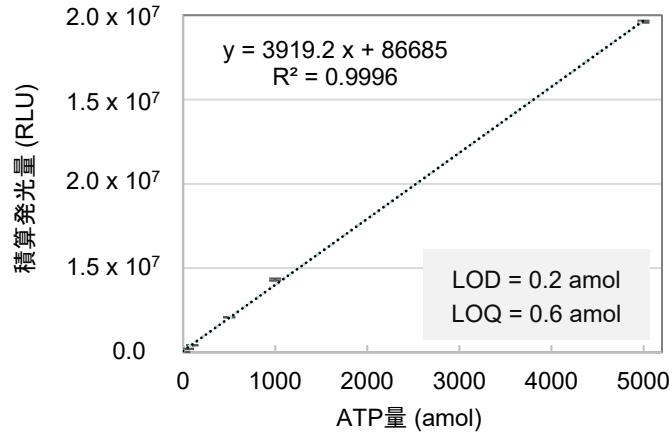


図4 ATP検量線例

0 ~ 5000 amolの範囲で直線性あり($R^2 = 0.9996$)

3. 頑健性(キャリーオーバー試験)

■ 測定試料: 高濃度ATP溶液(10000 amol)と抽出液(0 amol)を交互に測定(各n=12)

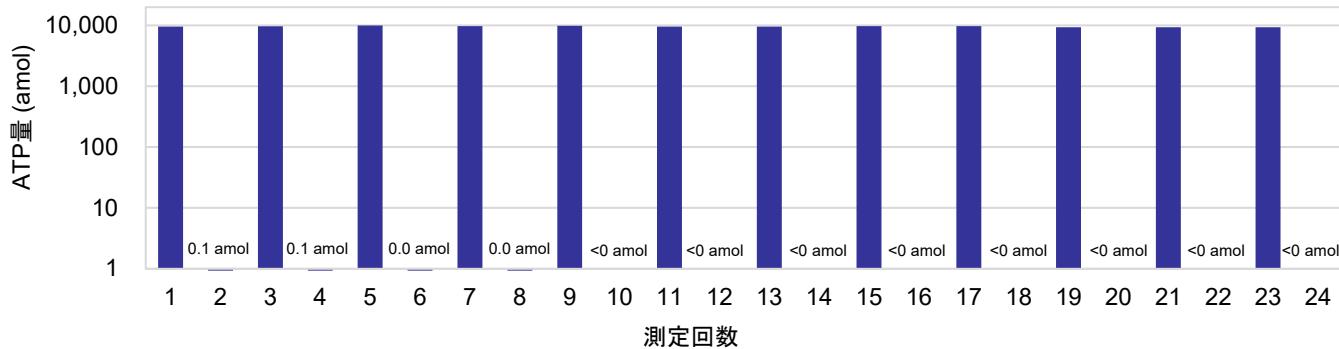


図5 キャリーオーバー試験 測定例

高濃度ATP溶液測定後でもキャリーオーバーは認められなかった

略称紹介

ATP:アデノシン三リン酸; Adenosine Triphosphate

LOD:検出限界; Limit of Detection / Detection Limit

LOQ:定量下限; Limit of Quantitation / Quantitation Limit

RLU:発光量を示す単位; Relative Light Unit

amol:アトモル; attomole / 1amol = 10^{-18} mol

SD:標準偏差; Standard Deviation

CV:変動係数、相対標準偏差; Coefficient of Variation

NC:陰性対照; ネガティブコントロール Negative Control

PC:陽性対照; ポジティブコントロール Positive Control

文献

- 1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 [分析法バリデーションに関するテキスト\(実施項目\)](#)
- 2) 日本規格協会 大河原正光著 [第5章 分析バリデーション](#)(標準化教育プログラム資料)

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。